

## **BAB IV**

### **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **4.1.1. Tempat**

Penelitian dilakukan di kandang dan Laboratorium Reproduksi Ternak, Loka Penelitian Sapi Potong, Grati Pasuruan.

##### **4.1.2. Waktu**

Penelitian dilaksanakan dalam jangka waktu 3 bulan mulai bulan Nopember 2016- Januari 2017.

#### **4.2. Alat dan Bahan**

##### **4.2.1. Alat**

Alat yang digunakan selama penelitian berlangsung, diantaranya: vagina buatan, *glass ware*, *waterbath*, termos, *obyek glass*, mikroskop, *cover glass*, *hemocytometer*, ose, gunting, *counter*, refrigerator, aluminium foil, thermometer, kalkulator, mikropipet, mikrotip, pH indikator, *Sperm Class Analyzer* (SCA) v. 2.1.

##### **4.2.2. Bahan**

Bahan yang akan digunakan selama kegiatan penelitian berlangsung, diantaranya: semen sapi jantan PO, Bali dan Madura (masing-masing 2 ekor) dengan motilitas progresif semen segar  $\geq 70\%$ , vaselin, air panas, semen, eosin-negrosin. Bahan pembuatan pengencer semen cair tertera pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Pengencer Semen Cair dan Komposisi Bahan dalam Pengencer.

Pengencer	Komposisi bahan dalam pengencer
Pengencer I (Tris Aminomethane)	tris 1,262 g; asam sitrat 0,762 g; laktosa 1,500 g; fruktosa 0,500 g; streptomycin 0,100 g; aquadest 80 ml dan penicillin 0,100 g; kuning telur 20%.
Pengencer II (CEP-2)	NaCl 15 mmol/L, KCl 7 mmol/L, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 3 mmol/L, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ 4 mmol/L, $\text{NaHCO}_3$ 11,9mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 8 mmol/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20 mmol/ L, Fruktosa 55 mmol/L, Sorbitol 1 g/L, Tris 133,7 mmol/L, gentamicin-S 0,05 g/L, asam sitrat 42 mmol/L, kuning telur 10% dan putih telur 0,4%.
Pengencer III (Susu skim)	susu skim 10 g, glukosa 0,9 g, aquades steril 100 ml, antibiotik (penisilin 100.000 IU dan streptomisin 100 mg), kuning telur 10%.

#### 4.3. Metode Penelitian

Metode penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorium. Terdapat tiga kelompok perlakuan pengencer semen cair dalam penelitian ini, yaitu:

- Perlakuan I (pengencer tris aminomethane, kuning telur 20%, tanpa raffinosa).
- Perlakuan II (pengencer CEP-2, kuning telur 10%, substitusi BSA dengan albumin 0,4%).
- Perlakuan III (pengencer susu skim, kuning telur 10%).

Penampungan sapi jantan dilakukan dengan menggunakan *teaser* (sapi jantan dan atau sapi betina pancingan) sampai dengan 10 kali ulangan. Semen segar yang didapatkan, dianalisa terlebih dahulu sebagai dasar untuk menentukan semen yang layak untuk diproses menjadi semen cair. Proses pembuatan semen cair dilakukan di Laboratorium dengan waktu observasi tertentu. Pakan yang diberikan selama

penelitian sesuai dengan pemberian di kandang Loka Penelitian Sapi Potong dengan diberikan pakan tambahan (suplementasi) berupa konsentrat dan hijauan tinggi protein (legume). Dilakukan evaluasi parameter motilitas secara berkala sampai dengan hari ke-5 (H5) penyimpanan dingin.

#### **Parameter kualitas semen**

- 1) pH, menggunakan kertas pH indikator, penilaian derajat keasaman semen dengan mencelupkan kertas pH indikator ke dalam semen dan dinilai berdasarkan standar penilaian yang tertera (Susilawati, 2011).
- 2) Warna, penilaian warna semen secara subyektif, diantaranya: bening, putih kekuningan atau putih susu. Semen berpotensi untuk bercampur dengan cecair, diantaranya: darah, nanah, urin, kotoran dll (Susilawati, 2011).
- 3) Volume, penilaian dilakukan dengan menampung semen menggunakan tabung berskala (Susilawati, 2011).
- 4) Konsistensi, penilaian derajat kekentalan diantaranya: encer, sedang dan pekat secara subyektif dengan menggerak-gerakan semen pada tabung berskala (Susilawati, 2011).
- 5) Konsentrasi, perhitungan tingkat kepadatan spermatozoa per 1 ml melalui pengenceran dan perhitungan jumlah spermatozoa. Perhitungan konsentrasi menggunakan *haemocytometer* (Ax *et al.*, 2008) yaitu dengan cara semen segar dihisap dengan pipet eritrosit sampai pada skala 0,5 kemudian larutan NaCl 3% dihisap sampai pada skala 101. Dilakukan pencampuran dengan hati-hati menggunakan gerakan membentuk angka delapan selama 2 – 3 menit. Tetesan pertama dibuang dan tetapkan satu tetes campuran pada kamar

hitung *neubauer* lalu ditutup dengan cover glass. Dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop pada pembesaran 200. Sel-sel spermatozoa di dalam 5 kamar dihitung menurut arah diagonal dengan setiap kamar mempunyai 16 ruangan kecil, maka di dalam 5 kamar terdapat 80 ruangan kecil. Seluruh gelas *haemocytometer* memiliki 400 ruangan kecil. Volume setiap ruangan kecil adalah  $0,1 \text{ mm}^3$  dan pengenceran 200 kali, rumusnya adalah sebagai berikut :

Konsentrasi = Jumlah spermatozoa x 10 Juta spermatozoa/ ml (Hafez, 2008).

- 6) Gerak Masa, merupakan penilaian secara subyektif terhadap gerakan kumpulan spermatozoa. Penilaian dilakukan dengan meneteskan spermatozoa pada kaca obyek cekung, kemudian diperiksa menggunakan mikroskop perbesaran 100 kali. Tingkat penilaian terhadap gerak massa, diantaranya:  
+++ = gelombang besar-besar, jumlahnya banyak, gelap, tebal dan cepat berpindah-pindah tempat. ++ = gelombang kecil-kecil jumlahnya sedikit, tipis, jarang, kurang jelas dan lambat berpindah. + = gelombang-gelombang tidak ada, hanya terlihat gerakan individu spermatozoa aktif progresif. 0 = adanya sedikit gerakan spermatozoa secara individu (Susilawati, 2011).
- 7) Viabilitas, penilaian viabilitas dilakukan dengan pembuatan preparat ulas dengan pewarnaan eosin-negrosin. Semen sebanyak 1 tetes diletakkan pada permukaan kaca obyek yang hangat, ditambahkan 1 tetes pewarna, dicampur kemudian diulas pada kaca obyek yang baru dan difiksasi dengan api. Preparat dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000 kali dan dihitung sampai dengan 100 spermatozoa. Spermatozoa hidup terlihat berwarna transparan, spermatozoa mati berwarna merah (sebagian/semua). Cara perhitungannya:

$\frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati (hidup dan mati)}} \times 100\%$

Jumlah spermatozoa yang diamati (hidup dan mati)

- 8) Motilitas, penilaian motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan *computer assisted sperm analyzer (CASA)* (Ax *et al.*, 2008). Analisis diawali dengan mengambil sampel semen cair sebanyak 3-4  $\mu\text{l}$ , diletakkan dalam *object glass* suhu 37°C dan tutup dengan *cover glass*. Mikroskop diposisikan pada perbesaran 10 x 10 dan fase kontras pH1. Dilakukan pemasangan *green filter* pada cermin reflektor dan diatur cahaya serta diafragma, disesuaikan dengan standar warna pada layar komputer (Anonymous, 2016). Pengambilan gambar spermatozoa pada layar monitor sebanyak 5 gambar (*field*). Hasil analisa berupa nilai rata-rata ataupun nilai setiap gambar tersaji dalam file excel.
- 9) Total spermatozoa motil (TSM) merupakan hasil perkalian konsentrasi spermatozoa, motilitas individu dan volume semen (Susilawati, 2011)
- 10) Abnormalitas spermatozoa, Abnormalitas spermatozoa terlihat sebagai bentuk spermatozoa yang tidak sesuai dengan standar, diantaranya: kepala kecil/ besar, kepala bentuk *pear*, kelainan ekor spermatozoa, kepala dobel dll (Hafez, 2008). Preparat ulas yang digunakan sama dengan preparat untuk menghitung persentasi hidup. Analisis preparat dengan mikroskop perbesaran 1000 kali sampai dengan 100 spermatozoa (Ax *et al.*, 2008). Cara perhitungannya adalah:

$\frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati (normal dan abnormal)}} \times 100\%$

Jumlah spermatozoa yang diamati (normal dan abnormal)

### Penampungan Semen

- Persiapan peralatan.
- Penampungan pagi hari (pukul 06:00-07:00 WIB).
- Persiapan *teaser* (betina birahi dan atau sapi jantan).
- Alat kelamin luar didesinfeksi (potong rambut).
- Dilakukan *false mounting* sampai dengan 3 x.
- Penampungan semen.

### Pengenceran Semen

Tahapan pelaksanaan pengenceran semen, diantaranya adalah:

1. Pembuatan pengencer tris aminomethane.

Diawali dengan pencampuran tris aminomethane, asam sitrat, laktosa dan fruktosa dalam tabung Erlenmeyer. Tambahkan aquades 80 ml dan diaduk menggunakan *stirrer* selama 15 menit sampai dengan homogen. Masukkan dalam panci dan dipanaskan sehingga mendidih kemudian suhu diturunkan sampai dengan 37°C. Tambahkan antibiotik penicillin dan streptomycin dan dihomogenkan selama 15 menit. Campuran dimasukkan dalam refrigerator sampai dengan hari ke-3, dipisahkan antara supernatan dan endapan. Supernatan yang didapatkan, ditambahkan kuning telur 20% siap untuk digunakan (Susilawati, 2011).

2. Pembuatan pengencer CEP-2.

Dilakukan pencampuran bahan-bahan sebagai berikut NaCl 15 mmol/L, KCl 7 mmol/L,  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  3 mmol/L,  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$  4 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  11,9 mmol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  8 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mmol/L, Fruktosa 55 mmol/L, Sorbitol 1 g/L, Tris 133,7 mmol/L, gentamicin-S 0,05 g/L, lalu ditambahkan

kuning telur 10%, albumin 0,4% dan, asam sitrat 42 mmol/L. Pengencer yang sudah jadi ditempatkan dalam tabung reaksi sampai mencapai pH 6,6 dan osmolaritas 320 mOsm (Sugiharto, 2014).

3. Pembuatan pengencer susu skim.

Dilakukan dengan mencampur 10 g bubuk susu skim dan 0,9 g glukosa dalam 100 ml aquades steril (*distilled water*), kemudian dipanaskan pada suhu 92-95°C selama 10 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Diberi antibiotik streptomisin 100 mg (Meiji, Japan) dan penisilin 100 000 IU (Meiji, Japan) (Arifianti dan Supriatna, 2007). Kuning telur ditambahkan dengan konsentrasi 10 % dalam larutan pengencer (Kulaksiz *et al.*, 2012).

4. Dilakukan penambahan semen ke dalam tabung yang telah berisi masing-masing pengencer tris aminomethane kuning telur, CEP-2 dan susu skim, secara bertahap sedikit demi sedikit dan kemudian menggoyang pelan-pelan agar larutan homogen. Semen diencerkan dengan konsentrasi 100 juta//ml. Perhitungan jumlah pengencer dan semen yang ditambahkan dalam pengencer adalah menggunakan rumus  $M_1V_1 = M_2V_2$ . M1 merupakan konsentrasi semen segar dan M2 merupakan konsentrasi standar semen cair yaitu 100 juta/ml. V1 merupakan volume semen segar dan V2 merupakan volume total (pengencer dan semen segar). Semen cair ditempatkan pada tabung reaksi kaca, ditutup dengan *plastic wrap* dan diletakkan dalam *backer glass* tanpa *water jacket*.

5. Penyimpanan semen cair dilakukan pada suhu 5°C (refrigerator) dan dievaluasi sampai dengan hari ke-5 (H5) penyimpanan dingin.

#### 4.4. Parameter Penelitian

Parameter yang diambil selama kegiatan penelitian berlangsung, diantaranya:

- Semen segar: volume, pH, warna, konsistensi, konsentrasi, gerak massa, viabilitas, motilitas, total spermatozoa motil, abnormalitas spermatozoa.
- Semen cair: motilitas, motilitas progresif, spermatozoa hiperaktif, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF dan ALH.

#### 4.5. Analisis Data

Rancangan percobaan dalam penelitian ini menggunakan pola tersarang (*nested*) dan rancangan acak lengkap (RAK). Analisis data menggunakan ANOVA (Minitab 17).

#### 4.6. Batasan Istilah

Pembatasan istilah untuk parameter motilitas spermatozoa semen cair dengan menggunakan CASA, diantaranya sebagai berikut:

##### 1. Motilitas

- a. Motilitas spermatozoa merupakan spermatozoa yang bergerak dengan kecepatan  $>5 \mu\text{m/s}$  (Massanyi *et al.*, 2008).
- b. Motilitas spermatozoa dalam penelitian ini merupakan persentasi spermatozoa yang bergerak dengan  $\text{VAP} > 0 \mu\text{m/s}$ . Merupakan penjumlahan dari 3 kategori gerakan spermatozoa menurut WHO, yaitu: *fast progressive*, *slow progressive* dan *motile non progressive*.



## 2. Motilitas progresif

- a. Motilitas progresif merupakan spermatozoa yang bergerak dengan kecepatan  $>20 \mu\text{m/s}$  (Massanyi *et al.*, 2008).
- b. Motilitas progresif dalam penelitian ini merupakan persentasi spermatozoa yang bergerak dengan  $\text{VAP} > 25 \mu\text{m/s}$ . Merupakan penjumlahan dari 2 kategori gerakan spermatozoa menurut WHO, yaitu: *fast progressive* dan *slow progressive*.

## 3. Hiperaktif spermatozoa

- a. Hiperaktif spermatozoa merupakan spermatozoa yang bergerak dengan batas nilai  $\text{LIN} < 60\%$ ,  $\text{ALH} > 7,5 \mu\text{m}$  dan  $\text{VCL} > 100 \mu\text{m/s}$  (Ripp *et al.*, 2003).
- b. Hiperaktif spermatozoa merupakan spermatozoa yang bergerak dengan batas nilai  $\text{LIN} < 60\%$ ,  $\text{ALH} \geq 5 \mu\text{m}$  dan  $\text{VCL} > 100 \mu\text{m/s}$  (Shibarani *et al.*, 2003).
- c. Hiperaktif spermatozoa merupakan spermatozoa yang bergerak dengan batas nilai  $\text{VCL} > 200 \mu\text{m/s}$  dan  $\text{LIN} < 20\%$  (Van der Horst, 2014).
- d. Hiperaktif spermatozoa dalam penelitian ini merupakan spermatozoa yang bergerak dengan batas nilai  $\text{VCL} > 150 \mu\text{m/s}$ ,  $\text{LIN} < 50\%$  dan  $\text{ALH} > 5 \mu\text{m}$ .

## 4. Velocity Curvilinear (VCL)

*Velocity Curvilinear* berarti *Curvilinear velocity* (VCL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve* (Sarastina, 2006).

5. *Velocity Straight Linear* (VSL)

*Velocity Straight Linear* (VSL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight* (Sarastina, 2006).

6. *Velocity Average Pathway* (VAP)

*Velocity Average Pathway* (VAP) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur.

7. *Linearity* (LIN)

*Linearity* merupakan indikator kelurusan lintasan *curvelinear*.

8. *Straighness* (STR)

*Straighness* merupakan indikator kelurusan lintasan rata-ratanya.

9. *Wobble* (WOB)

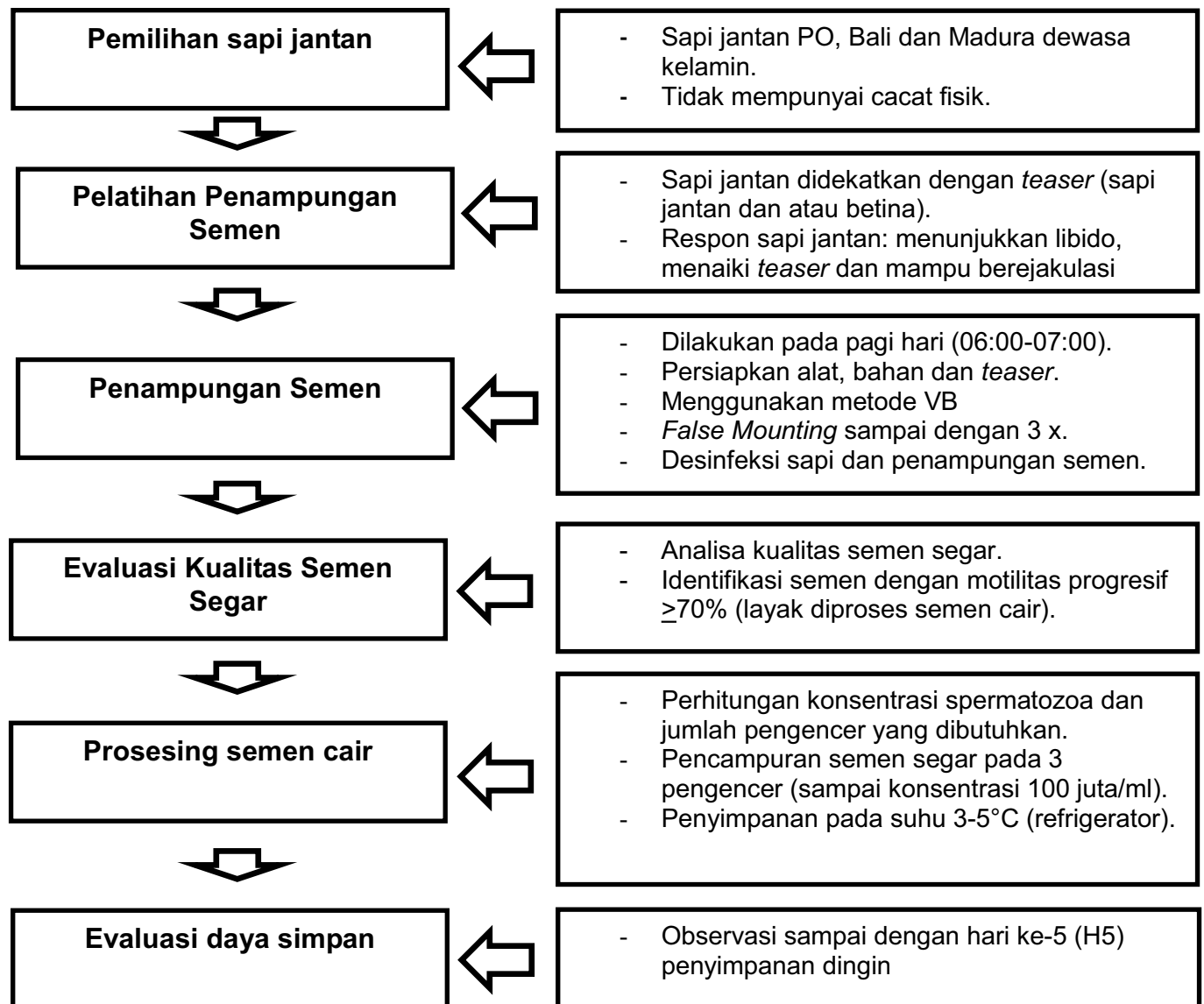
*Wobble* merupakan pengukuran osilasi lintasan sebenarnya, mengindikasikan kuatnya goyangan spermatozoa selama satu detik.

10. *Amplitude Lateral head* (ALH)

*Amplitude Lateral head* menunjukkan lebar rata-rata dari osilasi (getaran atau vibrasi) kepala spermatozoa saat berenang (Kathiravan *et al.*, 2011).

11. *Beat Cross Frequency* (BCF)

*Beat Cross Frequency* merupakan frekuensi (banyaknya) lintasan spermatozoa melalui rata-rata alur per detik.



**Gambar 3.** Kerangka Operasional Penelitian